

**PATENT ABSTRACTS OF JAPAN**(11)Publication number : **09-056391**(43)Date of publication of application : **04.03.1997**

(51)Int.Cl.

C12P 19/04  
C08B 37/00  
C12N 1/14  
//(C12P 19/04  
C12R 1:645 )  
(C12N 1/14  
C12R 1:645 )

(21)Application number : **07-234691**(71)Applicant : **NIPPON OIL CO LTD**(22)Date of filing : **21.08.1995**

(72)Inventor : **WATANABE KIMIKO  
TAKAGI MIKIHIRO  
SAKAYANAGI SADA  
MIZUTA YOSHITAKA**

**(54) PRODUCTION OF BETA-1,3-GLUCAN**

(57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To produce non-colored  $\beta$ -1,3-glucan having a prescribed high branching degree and molecular weight.

**SOLUTION:** A mutant belonging to genus *Aureobasidium*, having productivity of  $\beta$ -1,3-glucan and substantially not producing melanin pigment is cultured in a liquid medium controlled within a range of 6.8 to 8.5pH, the produced  $\beta$ -1,3-glucan is separated and collected to produce the objective  $\beta$ -1,3-glucan. In the process, *Aureobasidium pullulans* FERM P-15096 is preferably used. Branching degree, molecular weight and yield, etc., can be adjusted by selecting culturing conditions.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination] **08.05.2002**

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] **3722522**

[Date of registration] **22.09.2005**

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-56391

(43) 公開日 平成9年(1997) 3月4日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 19/04			C 1 2 P 19/04	A
C 0 8 B 37/00			C 0 8 B 37/00	C
C 1 2 N 1/14			C 1 2 N 1/14	A
// (C 1 2 P 19/04				
C 1 2 R 1:645)				

審査請求 未請求 請求項の数 3 F D (全 9 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平7-234691	(71) 出願人	000004444 日本石油株式会社 東京都港区西新橋1丁目3番12号
(22) 出願日	平成7年(1995) 8月21日	(72) 発明者	渡邊 君子 神奈川県横浜市中区千鳥町8番地 日本石 油株式会社中央技術研究所内
		(72) 発明者	高木 幹弘 神奈川県横浜市中区千鳥町8番地 日本石 油株式会社中央技術研究所内
		(72) 発明者	阪柳 定男 神奈川県横浜市中区千鳥町8番地 日本石 油株式会社中央技術研究所内
		(74) 代理人	弁理士 藤野 清也 (外1名) 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】  $\beta$ -1, 3-グルカンの製造法

(57) 【要約】

【課題】 所定の高分岐度及び分子量を有し、着色されていない $\beta$ -1, 3-グルカンの製造法の提供。

【解決手段】 pH6.8 ~8.5 の範囲に制御した液体培地中で、オーレオバシディウム(Aureobasidium) 属に属する、 $\beta$ -1, 3-グルカン産生能を有し、メラニン色素を実質的に産生しない変異体を培養し、産生される $\beta$ -1, 3-グルカンを分離採取する $\beta$ -1, 3-グルカンの製造法。オーレオバシディウム プルランス(Aureo basidium pullulans) FERM P-15096 が用いられる。培養条件の選択により分岐度、分子量、収量等を調整することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 pHを6.8～8.5の範囲内に制御した液体培地中で、オーレオバシディウム (*Aureobasidium*) 属に属する微生物を突然変異させて得られる、 $\beta$ -1, 3-グルカン産生能を有し、メラニン色素を実質的に産生しない変異株を培養し $\beta$ -1, 3-グルカンを産生せしめ、これを採取することを特徴とする $\beta$ -1, 3-グルカンの製造法。

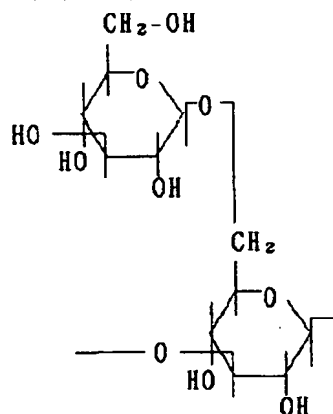
【請求項2】  $\beta$ -1, 3-グルカンが、グルコース残基1個が $\beta$ -1, 6-結合で高度に分岐した $\beta$ -1, 3-グルカンである請求項1記載の製造法。

【請求項3】 変異株がオーレオバシディウム プルランス (*Aureobasidium pullulans*) 受託番号 FERM P-15096である請求項1記載の製造法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、オーレオバシディウム (*Aureobasidium*) 属に属する微生物の突然変異株を用いて $\beta$ -1, 3-グルカン、特にグルコース残基1個が $\beta$ -1, 6-結合で高度に分岐した $\beta$ -1, 3-グル



【I】

【0004】 一方、 $\beta$ -1, 6-結合でグルコース1個が高度に分岐した $\beta$ -1, 3-グルカンは安定性に優れ、経口投与により免疫賦活性を有しており感染症予防剤、抗腫瘍剤として、さらには凝集剤や乳化安定剤としての工業的な利用も拡大してきている。このような用途の拡大と共に多種多様の分岐度、分子量を有する各種の $\beta$ -1, 3-グルカンが求められるようになっていく。従来、きのこ類や微生物など種々の生物を用いて多種類の $\beta$ -1, 3-グルカンが生産されてきたが、通常、同一の生物で得られるものはほぼ同一の分岐度、ほぼ同一の分子量を有する $\beta$ -1, 3-グルカンであり、同一生物で異なった分岐度のものを生産することは行われていなかった。

【0005】 本発明者らは、先にオーレオバシディウム属に属する微生物を用いて高度に分岐した $\beta$ -1, 3-

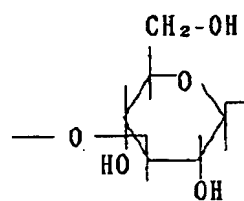
カンを製造する方法に関する。本発明の方法で得られた $\beta$ -1, 3-グルカンは、医薬、食品添加物、飼料添加物として利用することができる。

## 【0002】

【従来の技術】 従来、式【I】および【II】から構成される $\beta$ -1, 6-結合でグルコース1個が分岐した高分子量の $\beta$ -1, 3-グルカンは知られている。たとえばシゾフィランはスエヒロタケの菌糸体の培養により得られ、抗腫瘍活性を有することが報告されている。また同様の構造を有するものとしてシイタケ (*Lentinus edodes*) からレンチナンが分離され、抗腫瘍活性を有する医薬品として使用されている。これらの $\beta$ -1, 3-グルカンの分岐度（主鎖の $\beta$ -1, 3-結合のグルコース単位の数（式【I】+【II】の数）に対する分岐した $\beta$ -1, 6-結合のグルコース単位の数（式【I】の数）の割合）はいずれも30～35%程度と低く、非経口的に利用されているのみである。

## 【0003】

## 【化1】



【II】

グルカンを生産することを見いだした（特開平6-340701号）。この高分岐度 $\beta$ -1, 3-グルカンは分岐鎖の分布に偏りがなく、均一な分布を持つ $\beta$ -1, 3-グルカンであった。しかしこの方法によればプルランを生産せず、 $\beta$ -1, 3-グルカンのみを生産するためには炭素源としてキシロースおよびビタミンCを必須とした。またオーレオバシディウム属に属する微生物は本来メラニン色素を産生するため培養液が緑黒色となり、そのため得られる $\beta$ -1, 3-グルカンも着色するという問題があった。またpHが高いところでは着色の程度が増加するために、特に高いpHでの培養では生産性を損なうという問題があった。このため培地のpHは4.5～6.5の範囲内に厳密に制御する必要があった（特開平6-340701、特開平7-51080）。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】このように従来の方法では培養液のpHや培養条件を大きく変化させて培養することが事実上不可能であり、その結果得られる $\beta$ -1, 3-グルカン生産量は生産量も低く、分子量および分岐度も限られた範囲のものしか得ることができず、用途の広がりに対して十分に対応できるものではなかった。このため生産性が高く、着色のない、しかも目的に応じた分子量および分岐度を有する $\beta$ -1, 3-グルカンを生産する方法が強く望まれていた。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記問題を解決すべく鋭意研究を重ねたところ、オーレオバシディウム属に属する微生物を突然変異させて得られる $\beta$ -1, 3-グルカン生産能を有し、メラニン色素を実質的に産生しない変異株を所定のpHに制御した液体培地中で培養することにより、プルランの産生が全くなく、無着色で高分岐度の $\beta$ -1, 3-グルカンを高生産量で生産することができることを見だし、本発明を完成するに至った。さらに本発明においては、後述するように種々の条件を適宜設定することにより広範囲の分岐度、分子量を有する $\beta$ -1, 3-グルカンを製造することも可能となった。すなわち、本発明はpHを6.8~8.5の範囲内に制御した液体培地中で、オーレオバシディウム属に属する微生物を突然変異させて得られる $\beta$ -1, 3-グルカン生産能を有し、メラニン色素を実質的に産生しない変異株を培養し、 $\beta$ -1, 3-グルカンを生産せしめ、これを採取することによりなる $\beta$ -1, 3-グルカンの製造法に関する。

【0008】以下に本発明を詳述する。本発明において用いられるオーレオバシディウム属に属する微生物を突然変異させて得られる $\beta$ -1, 3-グルカン生産能を有し、メラニン色素を実質的に産生しない変異株としては、例えばオーレオバシディウム プルランス ATCC 9348株、ATCC 3092株、ATCC 42023株、IFO 4464株、IFO 4466株、IFO 6353株、IFO7757株などを突然変異処理し、実質的にメラニン色素を産生しない菌株を選別し、その中から $\beta$ -1, 3-グルカンを高生産する変異株を選別することにより得ることができる。

【0009】突然変異処理はUV照射あるいは化学的処理により行うことができる。化学的処理としては、たとえばニトロソグアニジン、エチディウム ブロマイド、メタンスルホン酸エチルまたは亜硝酸ナトリウムなど一般的に行われている変異処理剤を用いることができる。次に、突然変異株をコロニーの形に培養し、コロニーに着色させ、親株の着色量よりも低い菌株を採取する場合はメラニン色素を産生し易いように、平板培地で培養した後、通常5~20℃程度の温度に保ってメラニン色素の産生を促進させた後に、着色していないコロニーを選別して、実質的にメラニン色素を産生しない菌株を選別する。本発明に用いるオーレオバシディウム属に属する微

生物を突然変異させて得られる $\beta$ -1, 3-グルカン生産能を有し、メラニン色素を実質的に産生しない変異株としては、具体的には工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されているFERM P-15096が好ましく用いられる。

【0010】この変異株をpHが6.8~8.5の範囲内に制御した液体培地中で培養することにより高分岐度の $\beta$ -1, 3-グルカンを得ることができる。培養中は、培地のpHが大きく変動するが、本発明においてはpHを6.8~8.5の範囲内に制御することが重要である。好ましくは、pHを7.0~8.5、より好ましくは7.0~8.0に制御する。本発明の変異株を上記範囲内のpHで培養することによりプルランの生産が著しく抑制されるため、 $\beta$ -1, 3-グルカンのみが生産される。pHが6.5より低い場合にはプルランなどの他の生産物が主に生成するようになり、また8.5よりも高くなると $\beta$ -1, 3-グルカンの生産は著しく減少する。本発明においては、培養中のpHを上記範囲内に制御することにより高分岐度の $\beta$ -1, 3-グルカンを生産できるが、好ましくはpHの変動値を $\pm 0.2$ 以内、より好ましくは $\pm 0.1$ 以内に制御するのが所定の高分岐度、高分子量を有する $\beta$ -1, 3-グルカンを生産するうえで好ましい。

【0011】pHを制御する方法としては、酸およびアルカリを用いる方法が採用される。pHの制御のために用いる酸およびアルカリの種類は特に限定されず、酸としては、例えば塩酸、硫酸、硝酸、燐酸、炭酸、シュウ酸、酢酸などの各種の鉱酸や有機酸を用いることができる。またアルカリとしては水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸アンモニウム、アンモニアなどを用いることができる。本発明における酸とアルカリのpH調製剤の組み合わせとしては、 $\beta$ -1, 3-グルカンの高生産性の観点から強酸と強アルカリまたは弱酸と弱アルカリの組み合わせが好ましく用いられる。具体的には、塩酸と水酸化ナトリウムの組み合わせ、または酢酸と炭酸ナトリウムの組み合わせが好ましく用いられる。一方、高分子量の $\beta$ -1, 3-グルカンを生産する観点からは、弱酸と強アルカリの組み合わせからなるpH調製剤が好ましく用いられる。具体的には、酢酸と水酸化ナトリウムの組み合わせを挙げることができる。用いられる酸およびアルカリの各溶液の濃度は特に限定されないが、通常0.1~1.0規定、好ましくは1~5規定である。添加量は、pHが6.8~8.5の範囲を逸脱しない量であれば特に制限はなく、適宜適量を添加するが、通常はpHセンサーと連動した添加装置が使用され、pHの変動値が $\pm 0.2$ 以内になるようにpH調製剤が添加される。

【0012】本発明においては、pH値、その変動幅、pH調製剤の組み合わせを種々設定することにより、所望の分岐度および分子量を有する $\beta$ -1, 3-グルカンを生産することができる。本発明においては、分岐度が60%以上の高分岐度の $\beta$ -1, 3-グルカンを得ることがで

き、上記条件の設定により60～95%の範囲の分岐度のもを目的に応じて調製することができる。

【0013】ここで分岐度は下記式で示される。

$$\left[ \frac{(\text{分岐した}\beta-1, 6\text{-結合のグルコース単位の数})}{(\text{主鎖の}\beta-1, 3\text{-結合のグルコース単位の数})} \right] \times 100(\%)$$

すなわち、式【I】と式【II】を用いれば下記式で示される。

$$[I]/([I]+[II]) \times 100(\%)$$

従って、本発明においては主鎖の $\beta-1, 3$ -結合のグルコース単位10に対し、分岐した $\beta-1, 6$ -結合のグルコース単位が6以上、例えば6～9.5の割合で有する高分岐度の $\beta-1, 3$ -グルカンを生産することができる。

【0014】分岐度の測定は通常NMRスペクトルにより行うことができる。例えば、高分岐度の $\beta-1, 3$ -グルカンを100℃でジメチルスルホキシドに溶解し、100℃に保持したまま測定した $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルの1例を図1に示す。ここで $S_1$ は式【I】中のC-6の炭素に帰属するピーク、 $S_2$ は式【I】および式【II】のC-3の炭素に帰属するピーク、 $S_3$ は式【I】および式【II】のC-1の炭素に帰属するピークである。この図1の $\delta$ 値84.5～87.0ppm域のスペクトルを拡大したのが図2である。図2の $\delta$ 値85.7ppmのシグナル $S_4$ は式【I】のC-3炭素に帰属し、86.2ppmのシグナル $S_5$ は式【II】のC-3炭素に帰属される。

【0015】さらに本発明においては、分子量を調整した $\beta-1, 3$ -グルカンを得ることができる。特にpH調整剤としての酸およびアルカリの組み合わせを適宜選択することにより所望の分子量を有する $\beta-1, 3$ -グルカンを得ることができ、通常、数平均分子量が50万～500万（ゲル濾過法）のものが任意に得られる。

【0016】本発明で使用する培地としては、炭素源、窒素源、リン、カリウム、マグネシウム等の炭素化合物、窒素化合物、無機塩などの必要な栄養成分を適宜含有する液体培地が用いられる。炭素源としては、グルコース、スクロース、キシロース、マンノース、シュクロース、フラクトース、ビタミンCなどが適宜用いられる。窒素源としては、硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム等が用いられ、無機塩としては、リン酸カリウム、塩化カリウム、硫酸マグネシウム、硫酸鉄などが用いられる。また必要に応じてビタミンB<sub>1</sub>を添加することもできる。

【0017】培養は、通常温度0～60℃、好ましくは10～40℃にて、通常1～10日間、好ましくは2～5日間、通気下に行われる。培養液中の溶存酸素量には特に制限はないが、10%以上、好ましくは15%以上に保つことが $\beta-1, 3$ -グルカンの生産量を増加させるうえで好ましい。本発明の好気培養においては、通常、培地を攪拌しながら培養が行われ、攪拌回転数は菌の生育とグルカ

ンの生産が増大するに従い増加させる方法が採用される。この方法により溶存酸素量を10%以上に保つことができる。例えば、培養液の攪拌翼段数を2～4段として攪拌回転数を培養初期は少なく、菌の生育とグルカンの生産に応じて徐々に増加させる。例えば培養初期では攪拌回転数を200rpmで行い、グルカンの生産が増大するに従い、徐々に回転数を600rpmまで増加させることにより溶存酸素量を10%以上、好ましくは15%以上に保持して培養を行う。これにより $\beta-1, 3$ -グルカンの生産量を大幅に増加させることができる。しかしながら、培養初期に攪拌回転数を必要以上に上げすぎると菌体に負荷がかかりすぎるため生産量は反対に低下してしまうので注意する必要がある。

【0018】培養終了後、培養液に遠心分離や濾過等の分離手段を施して培養液から菌体を除去し、培養上清から $\beta-1, 3$ -グルカンを採取する。採取方法は特に限定されないが、培養上清に有機溶媒を加えて $\beta-1, 3$ -グルカンを沈殿させる方法を好ましく用いることができる。有機溶媒としては特に制限はないが、例えばメタノール、エタノール、イソプロパノールなどのアルコール類、アセトンなどのケトン類、アセトニトリルなどのニトリル類等を好ましく用いることができ、特にエタノールが好ましい。得られる $\beta-1, 3$ -グルカンはそのまま種々の用途に使用することができるが、用途に応じ精製することもできる。

【0019】本発明により得られる $\beta-1, 3$ -グルカンは経口あるいは非経口投与によって抗腫瘍活性あるいは免疫賦活活性を示し、医薬品としてあるいは食品添加剤、飼料添加剤として用いることができる。

【0020】

【発明の効果】本発明の方法により、高分岐度の $\beta-1, 3$ -グルカンを高生産量で生産することができ、さらにその培養条件を適宜設定することにより所定の分岐度及び分子量を有する $\beta-1, 3$ -グルカンを製造することが可能となった。また、培養により培地が着色せず、着色していない $\beta-1, 3$ -グルカンを得ることができ、精製が容易となった。

【0021】

【発明の実施の形態】以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【実施例1】オウレオバシディウム プルランス(*Aureobasidium pullulan*)をポテトデキストロース寒天斜面培地で培養し、保存菌株とし、表1に示す組成を有する液体培地A(pH5.0～6.0)10mLを試験管に入れたものに接種して28℃、一夜培養した培養液1mLを集菌し、0.2M酢酸緩衝液(pH5.6)1mLで2回洗浄後、0.04重量%のN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンを含む0.2M酢酸緩衝液(pH5.6)を調製し、該溶液中に30℃で60分間静置して突然変異処理を行った。次に、この変

異処理液を集菌し、0.2mol/L酢酸緩衝液 (pH5.6)で洗浄した後、寒天培地 (表2に示す組成を有する液体培地Bに寒天を1.5重量%添加したもの) 上に塗布して2~3日間培養後、さらに4~10℃の低温中に1~2日静置した。低温に静置するとほとんどの菌株は緑黒色のコロニーを形成するが、無色あるいは着色量の少ないコロニーを選択した。この選択したコロニーについて500mLの坂口フラスコに培地A 200mLを用いて、30℃、120rpmで4日間振とう培養した後に $\beta$ -1, 3-グルカンの生産量を測定し、生産量の高い変異株を選別した。その結果を表3に示した。この変異株を工業技術院生命工業技術研究所に寄託し、受託番号FERM P-15096を得た。

## 【0022】

## 【表1】液体培地Aの組成

スクロース	30 g
ビタミンC	3 g
NaNO <sub>3</sub>	2.5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0 g

KCl	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5 g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.01 g
蒸留水	1 L
pH	6.0

## 【0023】

## 【表2】液体培地Bの組成

グルコース	30 g
酵母エキス	2.0 g
NaNO <sub>3</sub>	0.5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0 g
KCl	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5 g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.01 g
蒸留水	1 L
pH	6.0

## 【0024】

## 【表3】

	コロニーの色 (平板培地上)	得られた $\beta$ -1,3-グルカン
元株	緑黒色	褐色
変異株	白色	白色

## 【0025】

【実施例2】表4に示す組成の培地を調製し、pH7.0に調整した。次に、実施例1で得られた変異株 (FERM P-15096) を2~3白金耳でかきとり、試験管中に入れた上記培地10mLに植菌し、25℃、120rpmで往復振とう培養を3日間行い、さらに500mLの坂口フラスコを用いて同様の培地200mL中に2重量%になるように接種して30℃、120rpmで30時間振とう培養した後、2段のディスクタービン翼付きの5Lの小型発酵槽に同様の培地2.5Lにフラスコ培養液を10重量%を植菌して、通気量1vvm、攪拌回転数を200rpmから600rpmまで徐々に上げて溶存酸素量を15%以上に保持して28℃で4日間培養した。培養の間、pH調整剤はアルカリとして5N水酸化ナトリウムを、酸として5N塩酸を用い、添加によりpHを7.0 $\pm$ 0.1に調整して培養を行った。

【0026】培養後、約1.5Lの水を加え、遠心分離機を用いて菌体を取り除いた。次いで、得られた培養上清を120℃、20分間オートクレーブにより加熱した。その後、同量のエタノールを加えて室温で数時間攪拌した。得られた沈殿物を遠心分離により分取し、沈殿物に0.5N水酸化ナトリウムを加えて室温で攪拌し、溶解させた。次に、未溶解物を取り遠心分離により除いた後、濃塩酸を用いて中和し、同量のエタノール中に添加して $\beta$ -1, 3-グルカンを沈殿させた。得られた $\beta$ -1, 3-グルカンの収量は15g/Lであった。得られた $\beta$ -

1, 3-グルカンの<sup>13</sup>C-NMRスペクトルを図3に示す。また85.0~87.0ppm域の拡大スペクトルを図4に示した。このスペクトルを測定したところ $\beta$ -1, 3-グルカンの分岐度は90%であり、また数平均分子量は300万 (ゲル濾過法)であった。

## 【0027】

## 【表4】培地の組成

グルコース	50 g
NaNO <sub>3</sub>	2.5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.7 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.7 g
KCl	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5 g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.01 g
蒸留水	1 L

## 【0028】

【実施例3】実施例2において、pHを変更した以外は実施例2と同様にし変異株の培養を行った。その結果を表5に示した。表5から明らかなように培養条件を変更することにより得られる $\beta$ -1, 3-グルカンの分岐度を制御することができた。なお、いずれの場合においてもプルランを産生しなかった。

## 【0029】

## 【表5】

pH	$\beta$ -1,3-グルカンの生産量(g/L)	分岐度(%)
6.5	1.4	9.2
7.0	1.5	9.0
7.5	8.0	8.5
8.0	7.5	8.3

## 【0030】

【実施例4】実施例2において、pH調整剤を表6に示す各種酸とアルカリの組み合わせに変更した以外は実施例2と同様にして変異株の培養を行った。その結果を表6に示した。表6から明らかなよう pH調整剤の組み合わ

せを適宜設定することにより得られる $\beta$ -1,3-グルカンの分子量を制御することができた。

## 【0031】

## 【表6】

pH調整剤		$\beta$ -1,3-グルカン	
酸	アルカリ	生産量 g/L	数平均分子量
塩酸	水酸化ナトリウム	1.5	300 万
塩酸	水酸化カリウム	7.2	500 万
塩酸	炭酸ナトリウム	1.0	100 万
酢酸	水酸化ナトリウム	9.0	500 万
酢酸	炭酸ナトリウム	1.0	400 万
硫酸	水酸化ナトリウム	6.0	400 万

## 【0032】

【実施例5】実施例2において、攪拌回転数を一定のまま培養した以外は実施例2と同様にして変異株の培養を行った。その結果を表7に示した。表7から明らかなように $\beta$ -1,3-グルカンの生産の増加に従い攪拌回転

数を徐々に増加させて溶存酸素量15%以上に保持した実施例2に比べ、生産量は低かった。

## 【0033】

## 【表7】

攪拌回転数(rpm)	$\beta$ -1,3-グルカの生産量(g/L)
300	5.0
600	3.5

## 【図面の簡単な説明】

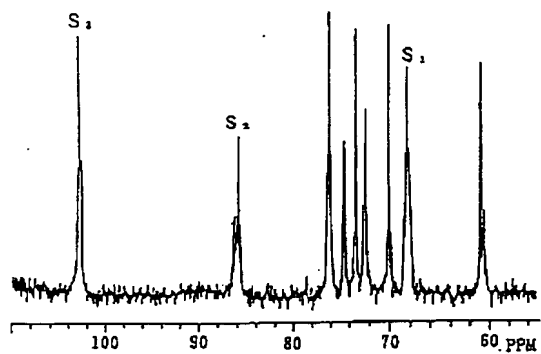
【図1】高分岐度の $\beta$ -1,3-グルカンの $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルを示す。

【図2】図1の $\delta$ 値84.5~87.0ppm域を拡大したスペクトルを示す。

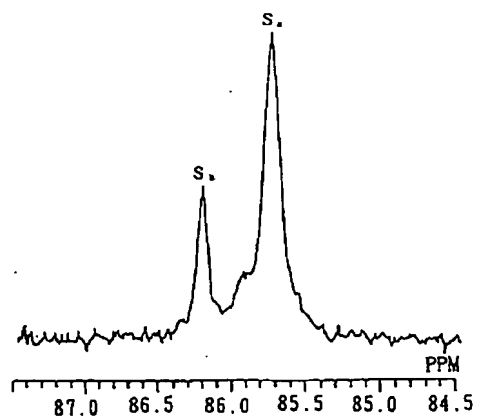
【図3】本発明の実施例2で得られた高分岐度 $\beta$ -1,3-グルカンの $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルを示す。

【図4】図3の $\delta$ 値85.0~87.0ppm域を拡大したスペクトルを示す。

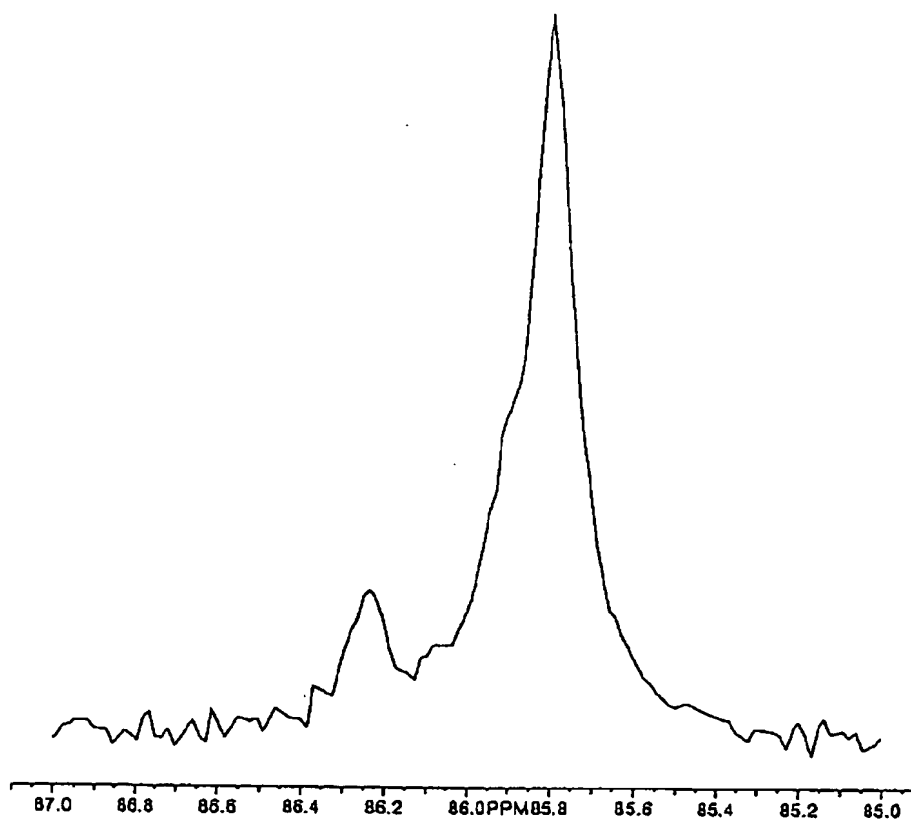
【図1】



【図2】

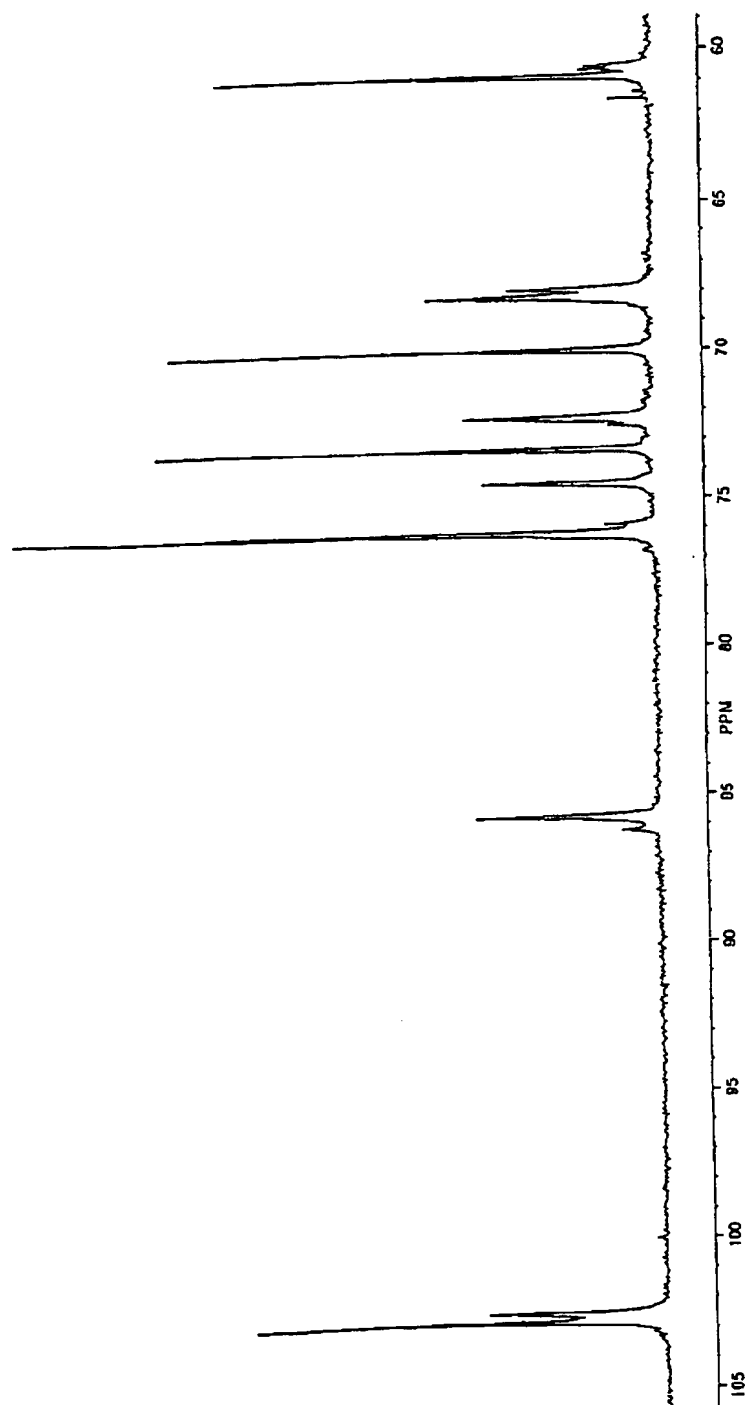


【図4】





【図3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
(C 1 2 N 1/14				
C 1 2 R 1:645)				

(72)発明者 水田 美能  
神奈川県横浜市中区千鳥町 8 番地 日本石  
油株式会社中央技術研究所内